



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación del efecto pantalla anti-UV de extractos de
3 especies de algas pardas de la costa peruana
mediante un método microbiológico en base al tiempo
de reducción decimal de Escherichia coli**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Joselyn Brenda VELEZ DE LA CRUZ

ASESOR

Mg. César Augusto CÓRDOVA CASTAÑEDA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Velez, J. (2019). *Evaluación del efecto pantalla anti-UV de extractos de 3 especies de algas pardas de la costa peruana mediante un método microbiológico en base al tiempo de reducción decimal de Escherichia coli*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CODIGO ORCID DEL AUTOR:

CODIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0002-9613-7866

DNI : 48164948

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

AUTOFINANCIAMIENTO

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS

LABORATORIO DE FICOLOGÍA MARINA, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 12°03'34.9"S 77°04'55.8"W

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

1 AÑO



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 18:20 horas del 11 de diciembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **JOSELYN BRENDA VELEZ DE LA CRUZ**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 029-EPMP-2019, la titulando expuso su tesis: **"EVALUACIÓN DEL EFECTO PANTALLA ANTI-UV DE EXTRACTOS DE 3 ESPECIES DE ALGAS PARDAS DE LA COSTA PERUANA MEDIANTE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO EN BASE AL TIEMPO DE REDUCCIÓN DECIMAL DE *Escherichia coli*"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **JOSELYN BRENDA VELEZ DE LA CRUZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 11 de diciembre de 2019.


Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(PRESIDENTE)


Mg. CESAR CORDOVA CASTAÑEDA
(ASESOR)


Mg. JORGE LEON QUISPE
(MIEMBRO)


Blga. JEANNE ALBA LUNA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres Yuri y Luz

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a los integrantes del Laboratorio de Ficología Marina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el tiempo dedicado, su asesoría y las facilidades brindadas.

Asimismo, hago extensivo mi agradecimiento a mi familia y amigos.

ABREVIATURAS

UVR	: Radiación ultravioleta
UV	: Ultravioleta
Anti-UV	: Anti ultravioleta
M.M.	: Método microbiológico
UV-ED	: Dosis eritemal ultravioleta
DRT	: Tiempo de reducción decimal
RP-HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
TSB	: Caldo tripticasa de soya
TSA	: Agar tripticasa de soya
EFG	: Equivalente de floroglucinol
ANOVA	: Análisis de varianza

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
	2.1. Radiación ultravioleta	3
	2.2. Protectores solares	4
	2.3. Las algas como protectores solares	5
	2.4. Sensibilidad de las bacterias ante la radiación ultravioleta	6
	2.5. Sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> ante la radiación ultravioleta	7
3.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
	3.1. Hipótesis	8
	3.2. Objetivos	8
	Objetivo general.....	8
	Objetivos específicos.....	8
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
	4.1. Material biológico	9
	4.2. Recolección y procesamiento de las algas.....	9
	4.2.1. Preparación de los extractos acuosos	11
	4.3. Cuantificación e identificación de polifenoles	12
	4.3.1. Cuantificación de polifenoles	12
	4.3.2. Identificación de polifenoles.....	13
	4.4. Preparación del inóculo de <i>Escherichia coli</i>	14
	4.4.1. Determinación precisa de UFC previo a los ensayos.....	14
	4.5. Cálculo del tiempo de reducción decimal	15
	4.6. Método microbiológico en base al tiempo de reducción decimal para evaluar el efecto pantalla anti ultravioleta	16
	4.6.1. Barrido en el espectro ultravioleta de los extractos de algas y controles positivos 16	
	4.6.2. Preparación de las pantallas para el ensayo de la actividad anti ultravioleta	16
	4.7. Cuantificación del efecto pantalla anti ultravioleta de algas pardas	17
	4.8. Procedimientos de análisis e interpretación de resultados	18
	4.8.1. Análisis primario	18
	4.8.2. Análisis estadístico	18
5.	RESULTADOS.....	19
	5.1. Cuantificación de polifenoles.....	19
	5.2. Identificación de polifenoles	19
	5.3. Estandarización del inóculo de <i>Escherichia coli</i>	21
	5.4. Cálculo del tiempo de reducción decimal	23
	5.4.1. Tiempo de reducción decimal para la radiación ultravioleta C	23
	5.4.2. Tiempo de reducción decimal para la radiación ultravioleta B.....	23

5.5. Barridos espectrofotométricos de los extractos algales	24
5.6. Cuantificación del efecto pantalla anti ultravioleta de extractos algales.....	26
6. DISCUSIÓN	29
7. CONCLUSIONES	32
8. RECOMENDACIONES	33
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
10. ANEXOS	38
Anexo 1. Prueba Chi-cuadrado de bondad de ajuste con un intervalo de confianza al 95 %.....	38
Anexo 2. Características de los materiales y equipos utilizados.....	39
Anexo 3. Factores ambientales que influyen la intensidad de la radiación ultravioleta.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de macroalgas utilizadas	9
Tabla 2. Especies de algas colectadas y código del extracto.....	12
Tabla 3. Preparación de muestras para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	13
Tabla 4. Cantidad de polifenoles de extractos de algal y SAHC.....	19
Tabla 5. Identificación de polifenoles en los extractos de algas	21
Tabla 6. Estimación de la concentración de <i>E. coli</i> después de 18 horas de incubación	22
Tabla 7. Porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-C	23
Tabla 8. Porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-B.....	24
Tabla 9. Porcentaje de transmitancia en las longitudes de 254 nm (UVR-C) y 312 nm (UVR-B) de los extractos algales, floroglucinol y SAHC a cuatro concentraciones distintas	25
Tabla 10. Porcentaje del efecto pantalla anti-UV de los extractos algales.....	27

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macroalgas, colecta y lugar de colección	10
Figura 2. Procesamiento del alga	11
Figura 3. Flujo de preparación de extractos acuosos	12
Figura 4. Placas petri con siembra de <i>E. coli</i> cubiertas con film U-Thil.	15
Figura 5. Instalación de pantallas de extractos	17
Figura 6. Cromatogramas de polifenoles estándares	20
Figura 7. Curva patrón para determinar la concentración de UFC de <i>E. coli</i>	22
Figura 8. Barridos espectrales en el rango ultravioleta para cada uno de los extractos de alga y SAHC	26
Figura 9. Lectura de las UFC sobrevivientes tratadas con los extractos algales a la irradiación con UVR-C y UVR-B	28

RESUMEN

El actual interés de la industria cosmeceútica y nutracéutica por las algas marinas se debe a sus numerosos efectos beneficiosos para la salud en la piel, como su capacidad fotoprotectora y de antienvjecimiento. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto pantalla anti-UV de los extractos de tres algas pardas de la costa peruana: *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices y *Petalonia binghamiae* (J. Agardh) K. L. Vinogradova. Se cuantificó los polifenoles presentes en los extractos algales con el método de Folin-Ciocalteu, se identificó mediante RP-HPLC y se determinó la actividad anti-UV con el método microbiológico de acuerdo con el tiempo de reducción decimal de *Escherichia coli*.

El valor máximo para la cantidad de polifenoles lo presentó *P. binghamiae* con 0,35 mg EFG/ml, seguido por *L. trabeculata* y *M. pyrifera*, con 0,32 mg EFG/ml en ambas. En las algas del orden Laminariales se identificó ácido gálico y ferúlico, entre otros polifenoles, mientras que *P. binghamiae* presenta únicamente ácido protocatecuico y ácido clorogénico. El mayor porcentaje de eficiencia anti-UV lo obtuvo el extracto de *L. trabeculata* con $33,50 \pm 2,93$ % anti-UV-C y $19,97 \pm 1,50$ % anti-UV-B.

Finalmente, mediante la adecuación del método microbiológico a partir del tiempo de reducción decimal de *E. coli*, se comprobó que las macroalgas ensayadas tienen un efecto pantalla anti-UV que varía dependiendo de la concentración y el tipo de polifenol presente.

Palabras clave: UVR, anti-UV, polifenoles, *Escherichia coli*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Petalonia binghamiae*

ABSTRACT

The current interest of the cosmeceutical and nutraceutical industry in marine algae is due to its numerous beneficial effects on skin health, such as its photoprotective and anti-aging capacity. The present study aimed to evaluate the anti-UV screen effect of the extracts of three brown algae from the Peruvian coast: *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices and *Petalonia binghamiae* (J. Agardh) K. L. Vinogradova. The polyphenols present in the algal extracts were quantified with the Folin-Ciocalteu method, identified by RP-HPLC and the anti-UV activity was determined with the microbiological method according to the decimal reduction time of *Escherichia coli*.

The maximum value for the amount of polyphenols was presented by *P. binghamiae* with 0.35 mg EFG / ml, followed by *L. trabeculata* and *M. pyrifera*, with 0.32 mg EFG / ml in both. In algae of the Laminareal order, gallic and ferulic acid was identified, among other polyphenols, while *P. binghamiae* only has protocatechic and chlorogenic acid. The highest percentage of anti-UV efficiency was obtained by *L. trabeculata* extract with $33.50 \pm 2.93\%$ anti-UV-C and $19.97 \pm 1.50\%$ anti-UV-B.

Finally, by adapting the microbiological method from the time of decimal reduction of *E. coli*, it was found that the macroalgae tested have an anti-UV screen effect that varies depending on the concentration and type of polyphenol present.

Keywords: UVR, anti-UV, polyphenols, *Escherichia coli*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Petalonia binghamiae*

1. INTRODUCCIÓN

La prevención del daño ocasionado por la radiación ultravioleta (UVR) tiene un desarrollo vertiginoso desde 1943, cuando se utilizó el ácido paraaminobenzoico (PABA) como fotoprotector. Actualmente, se recomienda el uso de ropa fotoprotectora, sombrero de ala ancha, gafas de sol y lo novedoso es el uso de protectores solares de amplio espectro de origen vegetal, que contienen compuestos antioxidantes y enzimas que intervienen en la reparación del DNA (Kullavanijaya y Lim, 2005).

La exposición excesiva a la UVR, ya sea esta de origen natural (solar) o artificial (lámparas de bronceado), provoca efectos dañinos para la salud humana debido a su efecto carcinogénico, especialmente en poblaciones con piel clara (cáncer de labios, piel y otros). Por otro lado, también estaría involucrada en enfermedades autoinmunes y virales, aunque para demostrarlo aún se necesitan más investigaciones al respecto (Gallagher y Lee, 2006).

El incremento en el uso de protectores solares para el cuidado de la piel, entre ellos los bloqueadores solares, ha permitido ahora tener una nueva categoría de contaminadores ambientales que afectan el ecosistema acuático (Díaz-Cruz y Barceló, 2009, Santos *et al.*, 2012). En particular, cuando los bañistas entran en contacto con las piscinas, la dilución de los protectores UV genera que sus compuestos químicos reaccionen con el cloro, lo que genera sustancias dañinas para el ecosistema (Santos *et al.*, 2012).

Actualmente, la elaboración de protectores solares aún más efectivos y ecoamigables es cada vez más requerida y, por ello, la búsqueda de compuestos activos naturales que ofrezcan un efecto pantalla anti ultravioleta (anti-UV) es clave para el éxito de estos productos (Díaz-Cruz y Barceló, 2009) (Santos *et al.*, 2012) (Kullavanijaya y Lim, 2005).

Asimismo, existe un gran interés de la industria cosmeceútica y nutracéutica por los ingredientes activos de algas marinas comestibles debido a sus numerosos beneficios

para la salud de la piel humana, su capacidad fotoprotectora y su efecto antienvjecimiento. Por ejemplo, los polifenoles de las algas pardas podrían actuar como agentes preventivos del cáncer y evitar la fotocarcinogénesis. Estos compuestos bioactivos juegan un rol importante en las algas para neutralizar la excesiva UVR-A y la UVR-B (Thomas y Kim 2011, 2013).

Es fundamental evaluar cuantitativamente el efecto anti-UV que las algas poseen mediante ensayos rápidos y confiables. La inhibición del crecimiento bacteriano por causa de la UVR en una bacteria como *Escherichia coli* hace que esta sirva como un modelo idóneo para determinar la eficiencia de los extractos de algas como prototipos de protectores solares (Gomaa *et al.*, 2008).

La meta del presente estudio es evaluar mediante un método microbiológico (M. M.) la actividad fotoprotectora de algas pardas de nuestras costas que podrían ser utilizadas por la industria nacional en la elaboración de protectores solares que no perturben el ecosistema marino y que promuevan la acuicultura.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UVR) es parte del espectro electromagnético de la radiación emitida por el Sol y se clasifica de acuerdo con su longitud de onda: UVR-A (315 a 400 nm), UVR-B (285 a 315 nm) y UVR-C (200 a 285 nm). La UVR-C es totalmente bloqueada por el ozono atmosférico, mientras que la UVR-B ingresa aproximadamente en un 10% a la superficie terrestre y la UVR-A ingresa totalmente (WHO, 2003). La actividad biológica que la UVR ejerce sobre la salud humana difiere según su longitud de onda (Moshammer *et al.*, 2016); por ejemplo, la sobreexposición a la UVR-B está asociada a quemaduras solares y daño de DNA, y como beneficio contribuye al proceso de síntesis de la vitamina D. Por otro lado, la exposición prolongada o sobreexposición a la UVR-A causa el fotoenvejecimiento (Ting *et al.*, 2003; WHO, 2003).

Diversos factores ambientales influyen en la intensidad con la que la UVR alcanza la superficie terrestre, como la latitud, la altitud, la reflexión del suelo, la concentración del ozono atmosférico, algunos compuestos orgánicos (WHO, 2003), el ángulo de elevación solar y la presencia de nubes (Bilbao *et al.*, 2011) (anexo 3). La reducción permanente y persistente de la capa de ozono debido a las actividades humanas trae como consecuencia el incremento de la UVR-B (Madronich *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 1999; WHO, 2003) y, consecuentemente, enfermedades como cáncer de piel y de labio, además de enfermedades oculares que incluyen la catarata cortical, algunas neoplasias conjuntivales, el melanoma ocular e incluso la degeneración macular (Gallagher y Lee, 2006; Gilbertz *et al.*, 2011).

Hay una necesidad de buscar índices de la UVR que relacionen el daño que puede ocasionar y, a la vez, sean fácilmente entendidas por todas las personas; en especial para aquellas más susceptibles a estos daños, población con piel clara que no puede

broncearse. El índice de *UV erythema dose* (UV-ED), el cual indica la cantidad de radiación que produce una quemadura solar, es el más utilizado (Moshammer *et al.*, 2016).

En Malasia, durante el 2015, se midió diariamente la cantidad de UV-ED y se encontró que, en promedio, el mayor valor de UV-ED mensual fue de 7711,43 J/m², durante el mes de abril, y la menor fue de 5518,13 J/m², en el mes de diciembre, lo cual demuestra una fuerte relación con las estaciones monzónicas y la declinación angular solar (radiación más intensa cuando el sol está cerca del ecuador y baja cuando se encuentra lejos de este) (Tan *et al.*, 2018). En España también se comprobó que el ángulo de elevación solar altera de manera directa la cantidad de UVR que llega a la superficie terrestre (Bilbao *et al.*, 2008, 2011).

Por otra parte, la nubosidad atenúa gran parte de la radiación solar, pero la UVR logra atravesar libremente las nubes así esté medianamente nublado (4 octas) o muy nublado (8 octas) (Foyo-Moreno *et al.*, 2003; Bilbao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Además, debemos tener en cuenta que el daño que ejerce la UVR en los humanos no solo proviene de la fuente natural, el Sol, también existe una fuente artificial de interés a la que el humano está expuesto, que son las camas de bronceado (Gallagher y Lee, 2006).

2.2. Protectores solares

Actualmente, el uso de protector solar es considerado como la medida de protección más importante y efectiva para prevenir las quemaduras solares, que son un factor de riesgo para el cáncer de piel (Diffey, 2001; Giokas *et al.*, 2007; González *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2012; Sánchez-Quiles y Tovar-Sánchez, 2014; Mancebo *et al.*, 2014). Los mecanismos de acción de los filtros en los protectores solares son la absorción, la reflexión y la dispersión de los rayos UV (Santos *et al.*, 2012). Un factor importante es el tiempo de protección; por ejemplo, en un ensayo con siete cremas bloqueadoras

solares comerciales, se demostró que la mayoría son inestables en el tiempo porque pierden su capacidad de bloquear los rayos UV (Gonzalez *et al.*, 2007). También se ha observado que las cremas bloqueadoras con un etiquetado de alta protección solar, en la práctica, no necesariamente evitan las quemaduras solares (Diffey, 2001).

Por otro lado el incremento en el uso de protectores solares para el cuidado de la piel, entre ellos las cremas bloqueadoras solares, en conjunto con la tendencia de habitar más frecuentemente la región costera, ha generado una nueva categoría de contaminadores ambientales que afectan el ecosistema acuático marino, al inhibir algunas especies de fitoplancton o estimular el crecimiento de otras debido a la introducción de micronutrientes presentes en ellos (Tovar-Sánchez *et al.*, 2013). Otro caso se produce cuando los bañistas entran en las piscinas y el contacto del agua con las cremas bloqueadoras genera que sus compuestos químicos reaccionen con el cloro y generen sustancias dañinas para nuestro ecosistema (Santos *et al.*, 2012).

2.3. Las algas como protectores solares

Las algas del intermareal están sometidas a largos períodos de emersión y, por ello, a una exposición directa a la radiación UV, lo que lleva a un estrés fotooxidativo. Estas especies tienen mecanismos de protección y reparación que involucra, en algunos casos, la presencia de compuestos fotoprotectores (polifenoles, pigmentos y otros) (Bischof *et al.*, 2007). Publicaciones anteriores han ensayado el efecto fotoprotector ante la UVR-B de extractos de macroalgas en embriones de peces cebra y han demostrado su alta capacidad fotoprotectora (Guinea *et al.*, 2012). En otro trabajo se usó ratones para demostrar la capacidad fotoprotectora de las algas (Hwang *et al.*, 2006). Asimismo, el contenido fenólico es directamente proporcional a la actividad antioxidante de las algas (López *et al.*, 2011).

Entre las algas marinas, se han estudiado especies de algas pardas como *Ecklonia cava*, *Eisenia arborea*, *Ecklonia stolonifera* y *Eisenia bicyclis* por sus actividades biológicas potenciales. La mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo

respecto de los florotaninos (polifloroglucinos), ya que han mostrado su potencial como inhibidor de la actividad fotoenvejecimiento en la piel de las personas (Thomas y Kim, 2011).

El término *cosmecético* se deriva de la fusión de los términos *cosmético* y *farmacético*, e indica que un producto específico contiene ingredientes activos (Thomas y Kim, 2013). Cabe resaltar que los fotoprotectores clásicos tienen una serie de controversias como la absorción de nanopartículas por la piel (Mancebo *et al.*, 2014), el impacto ambiental que ocasionan en los ecosistemas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2013) y el cumplimiento de la correcta aplicación de estos (Vogel, 2010). Por eso, actualmente, las algas generan un gran interés cosmecético debido a sus múltiples capacidades fotoprotectoras y de antienvjecimiento (Thomas y Kim, 2013).

2.4. Sensibilidad de las bacterias ante la radiación ultravioleta

El conocimiento de la sensibilidad de los microorganismos a la radiación UV se conoce desde mucho antes que los efectos perjudiciales que causan en los humanos y otros seres vivos (Hockberger, 2002). En un ensayo con medio de cultivo en recipientes parcialmente tapados que permiten el contacto con contaminantes del aire suburbano de Londres, se demostró que la luz solar previene la proliferación de bacterias y hongos, lo que dio inicio a los estudios de fotobiología y el efecto de la UVR sobre las bacterias (Downes y Blunt, 1877).

Por eso, el daño letal en las bacterias ante la UVR-A y la UVR-B es posible si se tiene en cuenta el tiempo de exposición (Santos *et al.*, 2013), mientras que para la UVR-C el daño letal, debido a la formación de los dímeros de pirimidina, es ampliamente conocido y estudiado (Sinha y Häder, 2002; Gomes *et al.*, 2005; Benabbou *et al.*, 2007; Eischeid y Linden 2007; Poepping *et al.*, 2014).

2.5. Sensibilidad de *Escherichia coli* ante la radiación ultravioleta

La búsqueda de métodos rápidos para demostrar las diversas bondades de las algas implica conseguir un modelo biológico rápido, confiable y económico. Se han analizado protectores solares comerciales mediante un método microbiológico basado en el tiempo de reducción decimal (DRT, por sus siglas en inglés) de *Escherichia coli* y se concluyó que las bacterias ofrecen una comprobación rápida y de bajo costo de la eficiencia de estos protectores en comparación con los métodos clásicos (Gomaa *et al.*, 2008).

Jones *et al.* (1998) y Gomaa *et al.* (2008), respectivamente, evaluaron el factor de protección solar de cremas comerciales mediante un ensayo con *E. coli* que consistía en irradiar con UVR-B placas petri recién sembradas con la bacteria, y estimar la efectividad a partir del número de colonias sobrevivientes. Ambos trabajos concluyeron que este ensayo microbiológico era una alternativa idónea para no trabajar con animales de experimentación como conejos, ratones sin pelo y personas voluntarias (Jones *et al.*, 1998), reducir gastos y obtener resultados rápidos (Gomaa *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis

- Hipótesis de trabajo = Los extractos de las algas de la costa peruana tienen efecto anti-UV.
- Hipótesis nula = El porcentaje de UFC es semejante al resultado de las placas irradiadas sin protección.
- Hipótesis alternativa = El porcentaje de UFC es diferente al resultado de las placas irradiadas sin protección.

3.2. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto pantalla anti-UV de los extractos de 3 especies de algas pardas de la costa peruana.

Objetivos específicos

- Cuantificar e identificar los polifenoles presentes en los extractos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Petalonia binghamiae*.
- Determinar si el M. M. basado en el número de UFC sobrevivientes de *Escherichia coli* es útil para la evaluación del efecto pantalla anti-UV.
- Cuantificar el efecto pantalla anti-UV mediante el M. M. de los extractos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Petalonia binghamiae*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Macrocystis pyrifera (fig. 1e), *Lessonia trabeculata* (fig. 1d) y *Petalonia binghamiae* (fig. 1c), macroalgas pardas utilizadas en el presente estudio, fueron recolectadas en el intermareal rocoso (fig. 1b) de la playa Mendieta (14°03'07" S, 76°16'46" W), en Pisco, Ica (fig. 1a). Se eligieron los días en los que la marea baja coincidía con las horas de la mañana en las que hay menor viento y oleaje, lo cual permitió una recolección manual más eficiente. La especie *L. trabeculata*, fue recolectada de material fresco varado.

Tabla 1. Especies de macroalgas utilizadas

PHYLUM	CLASE	ORDEN	ESPECIE
Ochrophyta	Phaeophyceae	Laminariales	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C.Agardh
			<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta & Santelices
		Ectocarpales	<i>Petalonia binghamiae</i> (J.Agardh) K.L.Vinogradova

4.2. Recolección y procesamiento de las algas

Todas las muestras fueron lavadas *in situ* con agua de mar para eliminar restos no deseados de arena y epífitos. Seguidamente, se secaron con papel toalla, se las colocó por separado en bolsas nuevas de polietileno e inmediatamente fueron puestas dentro de una cámara de conservación (8 °C) con hielo granizado. Se las transportó al Laboratorio de Ficología Marina de la UNMSM en un plazo no mayor de 8 horas, donde cada muestra se sometió a un chorro rápido de agua de caño para eliminar la sal e, inmediatamente, se extendió sobre papel kraft y bajo sombra con la finalidad de arearlas toda la noche. Para el secado, las macroalgas fueron colocadas sobre dos capas de gasa dentro de un desecador de convección Memmert GmbH + Co.KG modelo UFE 400 por 4 horas a 60 °C (fig. 2a), molidas de inmediato en un molino

eléctrico Moulinex (anexo 2) (fig. 2b) y pasadas por un tamiz de plástico de 500 μm (fig. 2c). El polvo tamizado se almacenó en bolsas herméticas en una campana de desecación hasta su uso.



Figura 1. Macroalgas, colecta y lugar de colección: a) Lugar de colección, playa Mendieta; b) Colecta de macroalgas en el intermareal rocoso; c) *Petalonia binghamiae*; d) *Lessonia trabeculata*; e) *Macrocystis pyrifera*.



Figura 2. Procesamiento del alga: a) Secado; b) Molido; c) Tamizado.

4.2.1. Preparación de los extractos acuosos

Los extractos fueron realizados siguiendo el método de Laura (2014). Se pesó en una balanza Kern®, modelo ABJ-220-4NM, 1 g del alga pulverizada y se diluyó en 20 ml de agua destilada en un matraz de 100 ml. La extracción se realizó en la autoclave a 121 °C y 15 lb por 30 minutos. A continuación, el extracto fue filtrado en caliente con 4 capas de tela organza estériles y luego centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Gemmy Industrial Corp. Modelo PLC-03. El sobrenadante fue recuperado y enrazado con agua destilada estéril a su volumen inicial de 20 ml.

Con el fin de reducir los sólidos suspendidos en el extracto, este se filtró mediante un filtro jeringa de 0,45 µm de poro y, finalmente, fue almacenado en refrigeración en un frasco ámbar estéril hasta el momento de su uso.

Los extractos fueron rotulados de acuerdo con la especie de alga y su fecha de colecta, con los códigos mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Especies de algas colectadas y código del extracto.

ALGA	FECHA DE COLECTA	CÓDIGO DEL EXTRACTO
<i>Lessonia trabeculata</i>	18/09/2014	LTJ18
<i>Lessonia trabeculata</i>	26/10/2016	LTJ26
<i>Macrocystis pyrifera</i>	18/09/2014	MPJ18
<i>Macrocystis pyrifera</i>	26/10/2016	MPJ26
<i>Petalonia binghamiae</i>	18/09/2014	PBJ18



Figura 3. Flujo de preparación de extractos acuosos: a) Pesado; b) Dilución del alga; c) Extracción a 121 °C, 15 lb de presión por 30 minutos; d) Filtrado en caliente.

4.3. Cuantificación e identificación de polifenoles

4.3.1. Cuantificación de polifenoles

La cuantificación de polifenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu y bajo la curva estándar ($y = 0,0008x - 0,0038$; $R^2 = 0,989$) de equivalentes de floroglucinol realizado por Santome *et al.* (2016). Para ello, con una micropipeta AxyPET modelo AP-1000/100-1000µl se separó 100 µl de extracto, 7,9 ml de agua

destilada, 500 µl de Folin-Ciocalteu Supelco 109001 y 1,5 ml de NaCO₃ Supelco 102405 al 20 % por muestra y por cada extracto se realizó tres réplicas (R1, R2 y R3). Como estándar se usó una solución de floroglucinol Supelco 107069 al 0,5 mg/ml. La adición de los reactivos fue hecha de acuerdo con la tabla 3 en frascos ámbar, se agitó y se mantuvo durante 2 horas en oscuridad refrigerada. Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS.

Tabla 3. Preparación de muestras para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

	R1	R2	R3	ESTÁNDAR	BLANCO
EXTRACTO	100 µl	100 µl	100 µl	-	-
FLOROGLUCINOL	-	-	-	100 µl	-
AGUA DESTILADA	6 ml	6 ml	6 ml	6ml	6,10 ml
FOLIN-CIOALTEU	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
CARBONATO DE SODIO AL 20 %	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml
AGUA DESTILADA	1,90 ml	1,90 ml	1,90 ml	1,90 ml	1,90 ml

4.3.2. Identificación de polifenoles

Los polifenoles de los extractos acuosos se identificaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de fase inversa (RP-HPLC) en las mismas condiciones que López *et al.* (2011); para ello, se utilizó un sistema de gradiente que implicó dos fases móviles. Eluyente A: agua con ácido fórmico al 0,1 % y eluyente B: metanol. El caudal fue de 1,0 ml/min y el volumen de inyección fue de 240 µl de extracto. El sistema funcionó a 27 °C. Las condiciones de elución que se aplicaron fueron 0-5 minutos, isocrático al 20 % de B; 5-30 minutos, gradiente lineal del 20 % al 60 % de B; 30-35 minutos, isocrático al 60 % de B; 35-40 minutos, gradiente lineal de 60 % a 20 % de B; se lavó y reacondicionó la columna. El monitoreo simultáneo para la identificación se estableció a 270 nm para los estándares (anexo 2) de los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, cafeico y siríngico; 324 nm para los ácidos clorogénico, cumárico y ferúlico, y 373 nm para miricetina y quercetina. Todo el proceso se realizó

en el Laboratorio de Equipamiento Especializado (LEE) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el equipo Chromaster, Hitachi High-Technologies y el *software* EZChrom Elite.

4.4. Preparación del inóculo de *Escherichia coli*

La reactivación de la cepa estándar *E. coli* ATCC 25922 se realizó en 4 ml de caldo tripticasa de soya (TSB), se incubó en una incubadora Incucell por 18 horas a una temperatura de 37 °C.

Una vez reactivada la bacteria *E. coli* se hicieron diluciones seriadas en TSB desde 1/10 hasta 1/10⁸; 100 µl de las diluciones 1/10⁶, 1/10⁷ y 1/10⁸ fueron diseminadas en placas con agar tripticasa de soya (TSA), tres réplicas por dilución y se llevó a la incubadora a 37 °C por 18 horas. Seguidamente, se determinó mediante el espectrofotómetro la absorbancia a 625 nm de las diluciones 1:10, 1:20, 1:10², 1:2x10², 1:10³ y 1:2x10³ teniendo como blanco al medio de cultivo TSB estéril.

4.4.1. Determinación precisa de UFC previo a los ensayos

Los datos de absorbancia obtenidos del espectrofotómetro fueron graficados con sus respectivas concentraciones de UFC/100 µl, las cuales se hallaron a partir del conteo de las diluciones sembradas. Al final, se obtuvo una curva estándar de UFC/100 µl vs absorbancia (fig. 7).

Se realizó la prueba Chi-cuadrado (bondad de ajuste) para comprobar que la ejecución del ensayo no ha influenciado los valores obtenidos experimentalmente, siendo estos el efecto o no de las variables ensayadas (anexo 1).

Posteriormente, para los ensayos de irradiación, la obtención del inóculo de *E. coli* se estableció a partir de la ecuación obtenida de la curva estándar UFC/100 µl vs absorbancia. Primero, se reactivó la cepa estándar *E. coli* ATCC 25922 en 3 ml de TSB y se incubó por 6 horas; seguidamente, en ambiente estéril, se separó 1,5 ml del cultivo en una cubeta de plástico y se leyó la absorbancia a 625 nm. Este resultado se reemplazó en la ecuación obtenida y se procedió a calcular rápidamente la dilución

necesaria para obtener una concentración aproximadamente de 100 UFC/100 μ l. Finalmente, se realizó la dilución requerida, la cual se sembró por diseminación con 100 μ l del cultivo cada placa de TSA y se cubrió con plástico adherente o film plástico de marca U-Thil (membrana transparente a UV) toda la parte superior de la base de la placa (fig. 4), siempre en ambiente estéril.



Figura 4. Placas petri con siembra de *E. coli* cubiertas con film U-Thil.

4.5. Cálculo del tiempo de reducción decimal

Las placas petri sembradas con *E. coli* se irradiaron a 15 cm de distancia con una lámpara UV Vilbert Lourmant modelo VL-6.MC, por intervalos de 5 segundos hasta 2 minutos. Para la irradiación de UV-C los tiempos empleados fueron 5", 10", 15", 30" y 45"; mientras que para UV-B los tiempos fueron 5", 10", 15", 30", 45", 60" y 120".

El DRT se calculó en base al número de colonias sobrevivientes respecto al control no irradiado, si el número de colonias era menor o igual al 10 % del número promedio de UFC del control; ese tiempo fue seleccionado como el valor del DRT. Para la radiación UVR-C se usó la longitud de 254 nm y para la UVR-B la longitud de 312 nm.

4.6. Método microbiológico en base al tiempo de reducción decimal para evaluar el efecto pantalla anti ultravioleta

4.6.1. Barrido en el espectro ultravioleta de los extractos de algas y controles positivos

Se prepararon 3 ml de cuatro concentraciones distintas de polifenoles: 0,02 mg EFG/ml, 0,04 mg EFG/ml, 0,06 mg EFG/ml y 0,08 mg EFG/ml de LTJ18, LTJ26, MPJ18, MPJ26, PBJ18 y del control positivo solución acuosa Heliocare (SAHC). La solución estándar de floroglucinol de 50 mg/ml fue diluida también a cuatro concentraciones: 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,06 mg/ml y 0,08 mg/ml.

En cubetas de cuarzo a todas las diluciones se les hizo un barrido espectral en el rango de luz ultravioleta (200 nm a 400 nm). De acuerdo con los gráficos obtenidos se evaluaron las concentraciones idóneas para ensayar el efecto pantalla anti-UV-C y UV-B (fig. 8).

La SAHC se preparó a partir del protector solar en pastillas Heliocare, en un vaso de precipitado de 50 ml de capacidad se disolvió 450 mg de la pastilla con 15 ml de agua destilada, se homogenizó con agitador magnético por 5 minutos, se vertió en un tubo centrífuga y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y con el fin de reducir sólidos suspendidos en la solución se pasó por un filtro jeringa de 0,45 μ m de poro. Finalmente, se almacenó en refrigeración en un frasco ámbar estéril hasta el momento de su uso. Al igual que a los extractos algales, la SAHC pasó por el proceso de cuantificación de polifenoles (ver 4.3.1).

4.6.2. Preparación de las pantallas para el ensayo de la actividad anti ultravioleta

Se siguió la metodología de Gomaa *et al.* (2008), con algunas modificaciones. En primer lugar, un volumen de 6,4 ml de cada extracto de la concentración elegida se gelificó con agarosa al 1,5 % en una base de la placa petri de 9 cm de diámetro, y se

consiguió un lente traslúcido de 1 mm de grosor. Como blanco se usaron lentes de agua destilada y, en el control negativo, se emplearon las placas sembradas no irradiadas.

Estos lentes fueron puestos sobre el plástico adherente que recubre las placas petri recién sembradas (fig. 5) y se irradió por un lapso igual al DRT seleccionado con una lámpara UV. Para la UVR-C se usó la longitud de 254 nm y para la UVR-B, la longitud de 312 nm.

Para los controles positivos, se ensayó de la misma manera que con los extractos usando floroglucinol, una crema comercial: Natura fotoequilibrio de 50 FPS y una solución acuosa del protector solar en pastillas Heliocare (SAHC).

En el caso de la crema, por su naturaleza, no fue gelificada, solo se esparció sobre el film plástico 98,1 mg ($1,5 \text{ mg/cm}^2$) y se irradió por un lapso de tiempo igual al DRT seleccionado para UVR-B.



Figura 5. Instalación de pantallas de extractos: a) Retiro; b) Colocación de pantalla gelificada sobre sobre el film U-Thil; c) Corrección de posición de pantalla, de ser necesaria.

4.7. Cuantificación del efecto pantalla anti ultravioleta de algas pardas

Una vez irradiadas las placas de cada tratamiento, se desechó solo los lentes de agarosa correspondientes y las placas rotuladas fueron incubadas durante 18 horas a 37 °C.

El número de UFC de cada placa fue cuantificado y para su procesamiento se expresó en porcentaje con respecto a la cantidad obtenida en el control negativo: placas no irradiadas que representan el 100%.

4.8. Procedimientos de análisis e interpretación de resultados

4.8.1. Análisis primario

La cuantificación del efecto pantalla anti-UV fue expresado en porcentaje de eficiencia, obtenido del conteo de UFC sobrevivientes a la UVR respecto del promedio del número de UFC de las placas no irradiadas (control -). El efecto pantalla eficiente de las variables ensayadas se considera en valores superiores al 10 %, de acuerdo con el DRT de *E. coli*.

4.8.2. Análisis estadístico

Con la finalidad de demostrar el efecto anti-UV de los extractos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Petalonia binghamiae*, se aplicó análisis de varianza (Anova) y la prueba de Tukey posterior para verificar las hipótesis estadísticas. También fueron utilizados análisis de media y dispersión de datos.

5. RESULTADOS

5.1. Cuantificación de polifenoles

Utilizando la ecuación de la curva estándar: $y = 0,0008x - 0,0038$; $R^2 = 0,989$ (Santome *et al.*, 2016), se cuantificó la cantidad relativa de polifenoles en los extractos de algas, miligramos de equivalente de floroglucinol por mililitro (mg EFG/ml) (ver tabla 4). Las muestras conservadas en el laboratorio muestran menor cantidad de polifenoles. *P. binghamiae* presenta el valor máximo para la cantidad de polifenoles, 0,35 mg EFG/ml, seguida por *L. trabeculata*, 0,32 mg EFG/ml y *M. pyrifera*, 0,32 mg EFG/ml. Un gramo de *P. binghamiae* contiene 7 mg EFG, mientras que una cápsula del producto comercial Heliocare contiene 2,70 mg EFG/ml.

Tabla 4. Cantidad de polifenoles de extractos de algal y SAHC

EXTRACTOS	mg EFG/ml DE SOLUCIÓN	mg EFG/g DE ALGA
LTJ26	0,32	6,40
LTJ18	0,19	3,80
MPJ26	0,32	6,40
MPJ18	0,14	2,80
PBJ18	0,35	7,00
SAHC	0,18	2,70*

*En una cápsula de Heliocare

5.2. Identificación de polifenoles

Se obtuvieron espectogramas para cada uno de los estándares y se graficó en conjunto según la longitud de onda utilizada durante las corridas. Los ácidos gálico, protocatecuico, clorogénico, vanílico y cafeico muestran picos de 5,2, 9,4, 14,9, 16,9 y 17,6 (tiempo de retención en minutos), respectivamente. Los ácidos siríngico, cumárico y ferúlico presentan picos de 18,0, 22,5 y 23,4, respectivamente. Finalmente, la miricetina y quercetina, presentan picos de 29,3 y 33,6 (fig. 6).

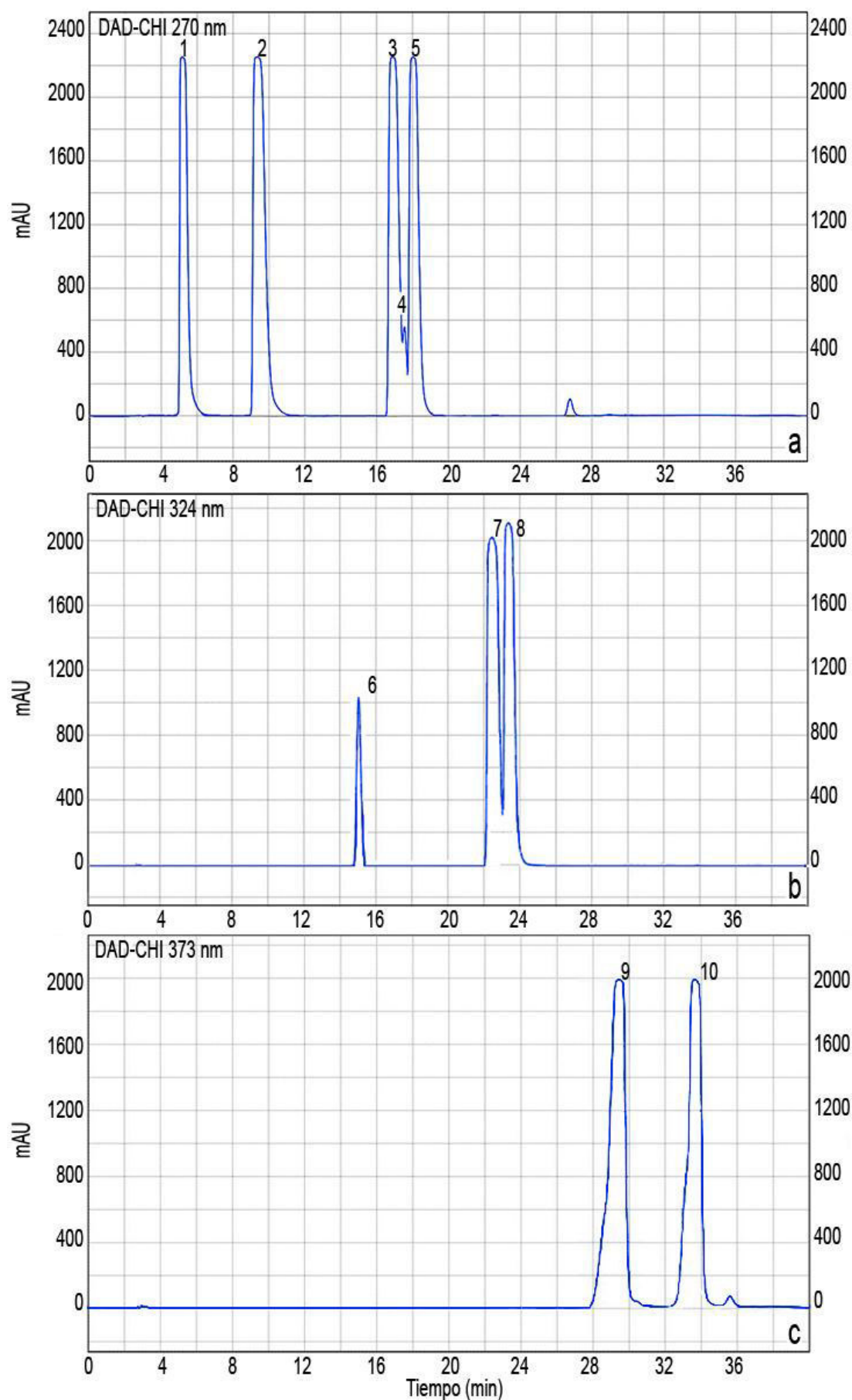


Figura 6. Cromatogramas de polifenoles estándares: a) 270 nm: pico 1: ácido gálico, pico 2: ácido protocatecuico, pico 3: ácido vanílico, pico 4: ácido cafeico, pico 5: ácido sirínigico; b) 324 nm: pico 6: ácido clorogégino pico 7: ácido cumárico, pico 8: ácido ferúlico; c) 373 nm: pico 9: miricetina y pico 10: quercetina.

La identificación de polifenoles presentes en los extractos se confirmó mediante la comparación de tiempos de retención y superposición de los espectros UV de los compuestos estándares en las tres longitudes de onda. Las algas pardas pertenecientes al orden Laminariales presentan ácido gálico y ferúlico, entre otros polifenoles. *P. binghamiae* presenta únicamente ácido protocatecuico y ácido clorogénico (tabla 5).

Tabla 5. Identificación de polifenoles en los extractos de algas

	LTJ18	LTJ26	MPJ18	MPJ26	PBJ18
GÁLICO	X	X	X	X	
PROTOCATECUICO		X	X	X	X
VANÍLICO		X	X		
CAFEICO			X		
SIRÍNGICO	X				
CLOROGÉNICO		X			X
CUMÁRICO					
FERÚLICO	X	X	X	X	
MIRICETINA					
QUERCETINA	X				

5.3. Estandarización del inóculo de *Escherichia coli*

Para la determinación de la concentración de *E. coli* en las diluciones, se seleccionó el conteo de las placas de la dilución $1:10^7$, ya que se encontraban dentro del rango de 30 a 300 UFC por placa. Las diluciones $1:10^6$ y $1:10^8$ tenían valores promedio de 654 y 2,5 UFC/placa respectivamente, por lo cual no se tomaron en cuenta (tabla 6).

En la dilución $1:10^7$ el promedio fue de 33,5 UFC por placa; de acuerdo con la ecuación $CI = P \times \frac{1}{D}$, donde CI es la concentración inicial del tubo previo a las diluciones, P es el promedio de UFC por placa y D es la dilución. El resultado de la

concentración inicial fue $33,5 \times 10^7$ UFC/ 100 μ l (tabla 6), la expresión en 100 μ l corresponde al volumen del inóculo sembrado.

Tabla 6. Estimación de la concentración de *E. coli* después de 18 horas de incubación

	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
PLACA 1	492	47	4
PLACA 2	692	45	0
PLACA 3	712	30	4
PROMEDIO	654	33,50	2.5
CI	$33,50 \times 10^7$ UFC/100 μ l		

Por lo tanto, la curva patrón de concentración de cultivo de *E. coli* (fig. 7) obtenida a partir de los datos de absorbancia vs. concentración de cultivo ($\times 10^6$ UFC/100 μ l) de las diluciones 1:10, 1:20, 1:10², 1:2x10², 1:10³ y 1:2x10³, obtuvo como ecuación $y = 77,843x - 0,6676$, $R^2 = 0,9912$.

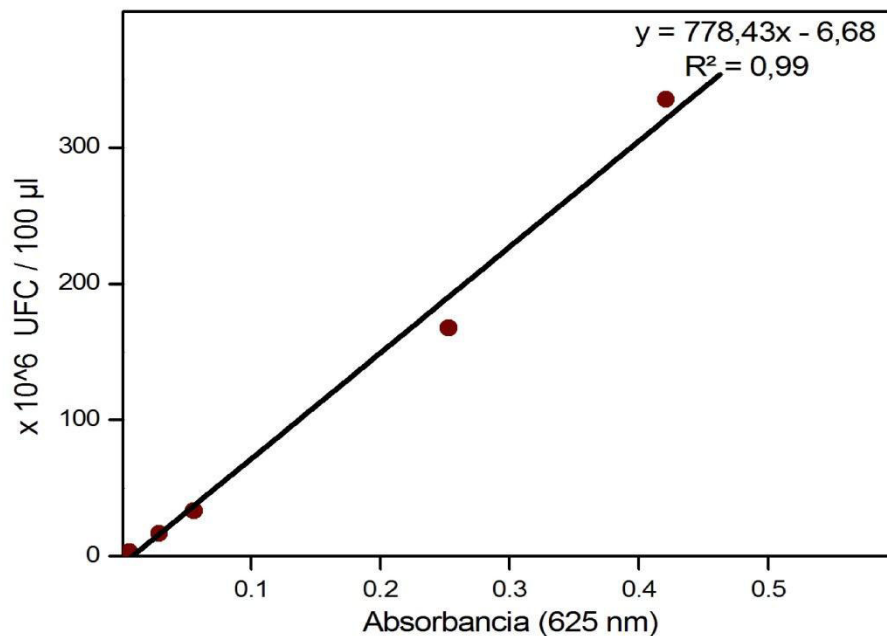


Figura 7. Curva patrón para determinar la concentración de UFC de *E. coli*.

La prueba de bondad de ajuste utilizando el Chi-cuadrado aceptó la H_0 , por lo que los números de UFC esperados con las UFC observadas (contabilizadas) no diferían significativamente entre sí: $\chi^2(25, N = 26) = 25,64$, $p=0,05$. Esto demostró que no existen factores ajenos que puedan influenciar en el experimento (anexo 1).

5.4. Cálculo del tiempo de reducción decimal

5.4.1. Tiempo de reducción decimal para la radiación ultravioleta C

El porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-C fue de $20,67 \pm 3,28$ % a los 5", $3,33 \pm 1,45$ % a los 10", $1,17 \pm 0,26$ % a los 15" y, finalmente, para los tiempos de 30" y 45", el porcentaje fue de 0 ± 0 % (tabla 7). Por lo tanto, el tiempo de reducción decimal para la irradiación UVR-C (254 nm) a una altura de 15 cm se observó a partir de los 10 segundos, seleccionándose el tiempo de 15" convenientemente.

Tabla 7. Porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-C

n	TIEMPO	PROMEDIO (%)	ETM
34	0	100	2,29
3	5"	20,67	3,28
3	10"	3,33	1,45
18	15"	1,17	0,26
3	30"	0	0
3	45"	0	0

5.4.2. Tiempo de reducción decimal para la radiación ultravioleta B

El porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-B fue del 96 % a los 5", del 38 % a los 10", del $32 \pm 3,81$ % a los 15", del $6,75 \pm 0,73$ % a los 30", del $2,17 \pm 0,31$ % a los 45", del $0,82 \pm 0,27$ % a los 60" y, finalmente, para el tiempo de 120" el porcentaje fue del 0 % (tabla 8). Por lo tanto, el tiempo de reducción decimal para la irradiación UVR-B (312 nm) a una altura de 15 cm se observó a partir de los 30 segundos en adelante, seleccionándose el tiempo de 60" convenientemente.

Tabla 8. Porcentaje de UFC sobrevivientes ante la UVR-B

n	TIEMPO	PROMEDIO (%)	ETM
34	0	100	2,29
1	5"	96	-
1	10"	38	-
4	15"	32	3,81
8	30"	7,75	0,73
6	45"	2,17	0,31
17	60"	0,82	0,27
1	120"	0	-

5.5. Barridos espectrofotométricos de los extractos algales

En el barrido espectrofotométrico, los extractos LTJ18, MPJ18, MPJ26 y PBJ18 mostraron un valor del 0 % de transmitancia en la longitud de 254 nm, a partir de la concentración 0,04 mg EFG/ml en adelante. LTJ26 mostró un valor del 2 % de transmitancia en dicha concentración; por lo cual, se eligió trabajar con la concentración 0,04 mg EFG/ml para los ensayos con *E. coli* bajo UVR-C.

En el caso de la longitud de 312 nm, el menor porcentaje de transmitancia se observó en la concentración de 0,08 mg EFG/ml en todos los extractos. LTJ18, MPJ18, MPJ26 y PBJ18 mostraron una transmitancia menor al 5 %, mientras que LTJ26 mostró un 19 % de transmitancia, muy diferente de LTJ18, que obtuvo solo un 2 %. Por lo tanto, se decidió que, en los ensayos con *E. coli* bajo UVR-B, se emplearía la concentración de 0,08 mg EFG/ml.

Por otro lado, el barrido espectrofotométrico del estándar floroglucinol presentó un 7 % de transmitancia en la concentración de 0,04 mg EFG/ml para la longitud de 254 nm y para 312 nm a la concentración de 0,08 mg EFG/ml obtuvo un 52 %, por lo cual fue usado únicamente en los ensayos de UVR-C. Finalmente, la SAHC para la longitud de

254 nm presentó un 3 % de transmitancia en la concentración de 0,04 mg EFG/ml y 0 % en la concentración de 0,08 mg EFG/ml para la longitud de 312 nm (tabla 9); sin embargo, se decidió solo emplearlo en los ensayos de UVR-B, ya que es un protector comercial.

Tabla 9. Porcentaje de transmitancia en las longitudes de 254 nm (UVR-C) y 312 nm (UVR-B) de los extractos algales, floroglucinol y SAHC a cuatro concentraciones distintas

	LONGITUD DE ONDA	PORCENTAJE DE TRANSMITANCIA (%)			
		0,08 mg EFG/ml	0,06 mg EFG/ml	0,04 mg EFG/ml	0,02 mg EFG/ml
LTJ18	254 nm	0	0	0	4
	312 nm	2	6	16	37
LTJ26	254 nm	0	0	2	12
	312 nm	19	27	43	63
MPJ18	254 nm	0	0	0	2
	312 nm	2	4	11	32
MPJ26	254 nm	0	0	0	7
	312 nm	5	9	21	49
PBJ18	254 nm	0	0	0	7
	312 nm	3	9	22	50
FLOROGLUCINOL *	254 nm	0	2	7	40
	312 nm	52	65	82	100
SAHC	254 nm	0	0	3	6
	312 nm	0	1	11	17

*Las concentraciones del estándar floroglucinol se encuentran en mg/ml.

En los gráficos de los barridos espectrales en el rango UVR-B y UVR-C se observó que todos los extractos de algas absorben y/o refractan en gran proporción estas longitudes de onda, lo que puede indicar su capacidad como bloqueadores. La SAHC tiene una mayor capacidad de absorber y/o refractar la UVR en las diferentes concentraciones de polifenoles ensayadas. LTJ18 y MPJ18 bloquean casi completamente, mientras que LTJ26, MPJ26 y PBJ18 dejan pasar del 20 % al 5 % de UVR-B en la concentración de 0,08 mg EFG/ml (fig. 8).

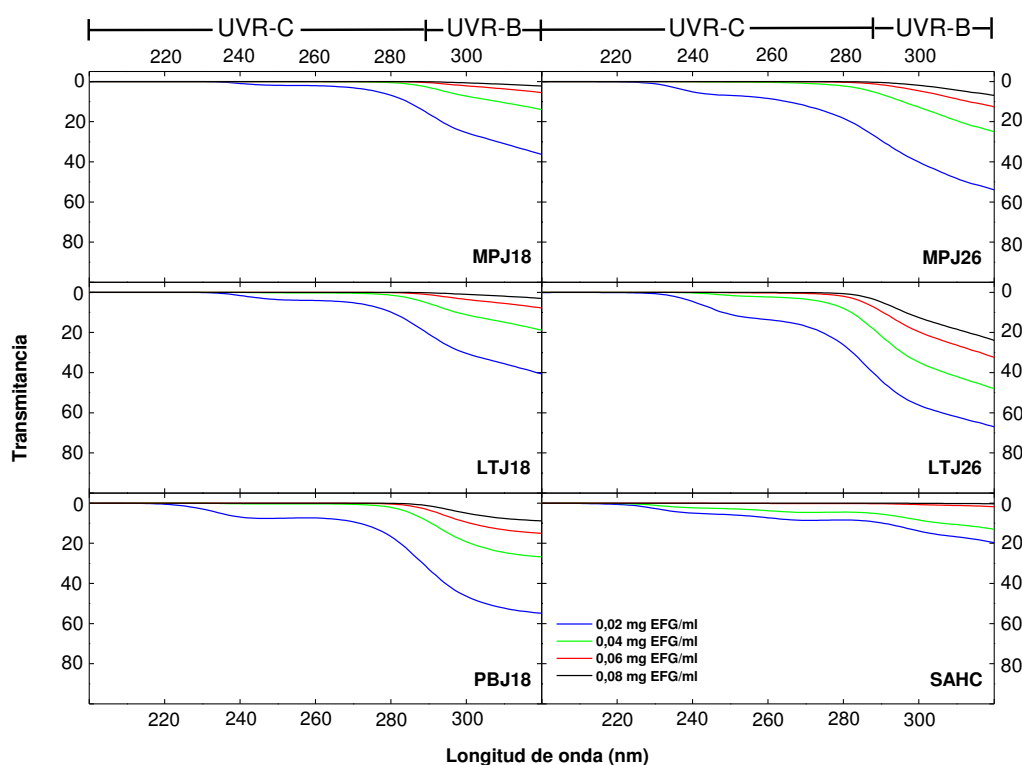


Figura 8. Barridos espectrales en el rango ultravioleta para cada uno de los extractos de alga y SAHC

5.6. Cuantificación del efecto pantalla anti ultravioleta de extractos algales

Todos los extractos algales mostraron un porcentaje de eficiencia anti-UV-C y anti-UV-B superior al blanco ($1,25 \pm 0,28$ % y $0,60 \pm 0,32$ %, respectivamente). El extracto LTJ18 registró el mayor porcentaje de eficiencia anti-UV-C y anti-UV-B: $33,50 \pm 2,93$ % y $19,97 \pm 1,50$ %, respectivamente. Los resultados de los extractos MPJ26 ($17,80 \pm 1,11$ %) y PBJ18 ($16,80 \pm 1,53$ %) superaron el 10 % de eficiencia anti-UV-C, mientras que MPJ18 ($9,60 \pm 2,61$ %) y LTJ26 ($4,00 \pm 2,92$ %) muestran protección anti-UV-C por debajo del 10 % de eficiencia, al igual que el estándar floroglucinol ($7,20 \pm 1,16$ %). Por otro lado, los extractos LTJ26 ($1,05 \pm 0,35$ %), MPJ18 ($2,55 \pm 0,84$ %), MPJ26 ($3,08 \pm 0,65$ %), PBJ18 ($1,60 \pm 0,85$ %) y la SAHC ($2,43 \pm 0,37$ %) no superaron el 10 % de eficiencia anti-UV-B. El control positivo de crema comercial Natura fotoequilibrio de 50 FPS obtuvo un valor del $92 \pm 4,9$ % anti-UV-B. Se hallaron diferencias significativas al realizar el Anova. Posteriormente, el análisis de comparación múltiple

determinó tres grupos homogéneos para el efecto pantalla anti-UV-C y tres grupos homogéneos para el efecto pantalla anti-UV-B.

Tabla 10. Porcentaje del efecto pantalla anti-UV de los extractos algales

	UVR-C : 254 nm, T: 15"		UVR-B : 312 nm, T: 60"	
	mg EFG/ml	EFICIENCIA (%)	mg EFG/ml	EFICIENCIA (%)
CONTROL		100,00 \pm 2,29 n = 34		
BLANCO		1,25 \pm 0,28 n = 16		0,60 \pm 0,32 n = 9
FLOROGLUCINOL *	0,04	7,20 \pm 1,16 n = 5 (a)		
CREMA NATURA **			1,50	91,60 \pm 4,85 n = 4 (c)
SAHC			0,08	2,43 \pm 0,37 n = 5 (a)
LTJ18	0,04	33,50 \pm 2,93 n = 6 (c)	0,08	19,97 \pm 1,50 n = 8 (b)
LTJ 26	0,04	4,00 \pm 1,30 n = 5 (a)	0,08	1,10 \pm 0,35 n = 4 (a)
MPJ18	0,04	9,60 \pm 1,17 n = 5 (a)	0,08	2,60 \pm 0,84 n = 3 (a)
MPJ26	0,04	17,80 \pm 1,11 n = 5 (b)	0,08	3,10 \pm 0,65 n = 4 (a)
PBJ18	0,04	16,80 \pm 0,28 n = 5 (b)	0,08	1,60 \pm 0,85 n = 3 (a)

* mg/ml

** mg/cm²

Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los extractos ($\alpha = 0,10$). Los datos se expresan como media \pm error típico de la media.

En el conteo de UFC sobrevivientes a la UVR-B y UVR-C en los distintos tratamientos con los extractos algales, LTJ18 muestra los valores más altos de UFC sobrevivientes en ambos rangos (33,50 \pm 2,93 % y 19,97 \pm 1,50 %). Todas las placas que fueron tratadas con los extractos algales y expuestas a las UVR-C presentaron un número de UFC superior al blanco. A pesar de que en el barrido espectral de la SAHC la transmitancia es igual a cero para la UVR-B, en el ensayo con *E. coli* no se contabilizó más de 2,43 \pm 0,37 % UFC sobrevivientes. Lo contrario ocurrió en el control de la crema comercial Natura, la cual tuvo un conteo muy semejante al control no irradiado (fig. 9).

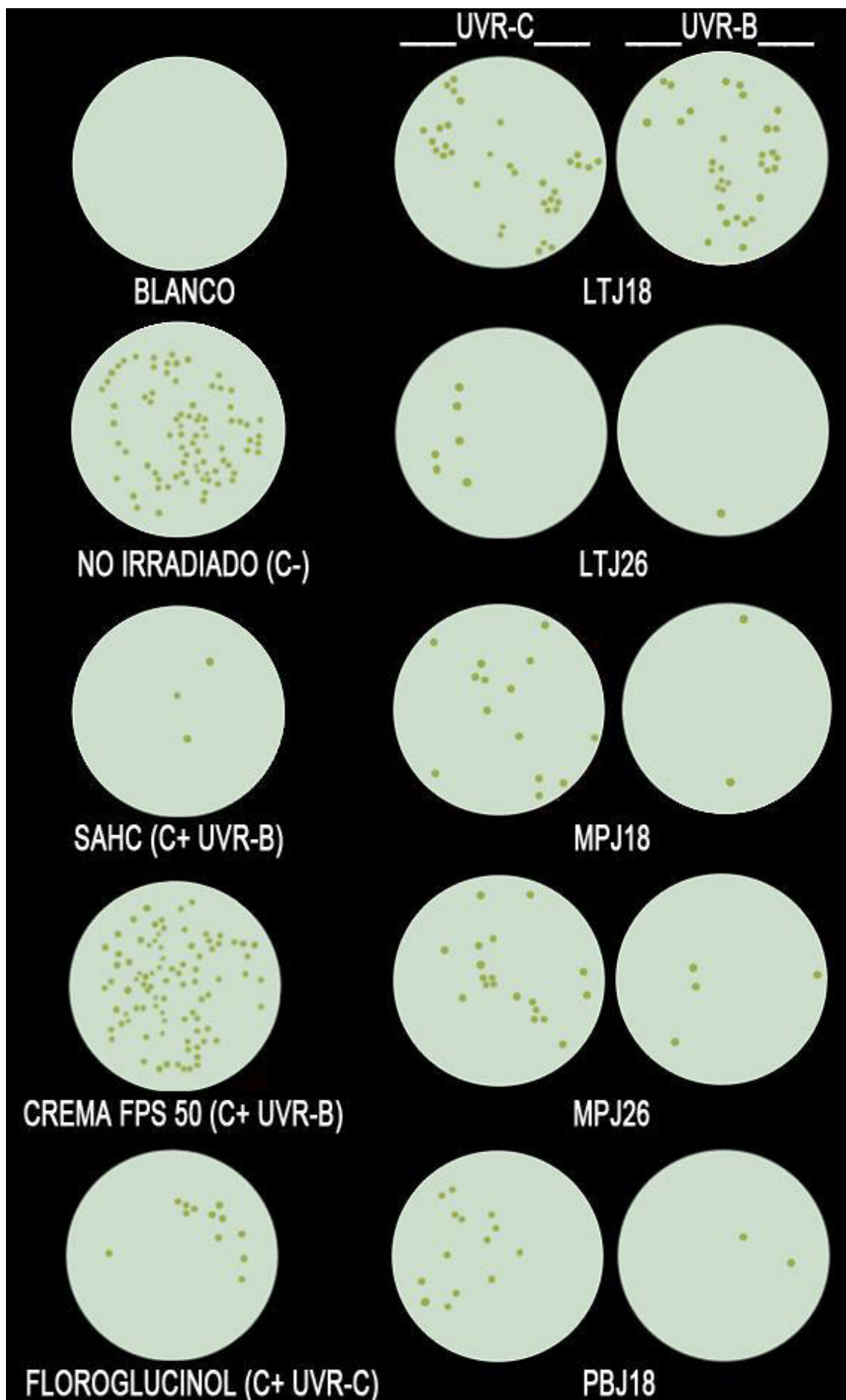


Figura 9. Lectura de las UFC sobrevivientes tratadas con los extractos algales a la irradiación con UVR-C y UVR-B

6. DISCUSIÓN

Se ha demostrado extensamente que los polifenoles presentes en los extractos de algas pardas tienen capacidad fotoprotectora y hasta fotoreparadora, según la cantidad y el tipo presentes en los extractos (Thomas y Kim 2013; Santome *et al.*, 2016; Berthon *et al.*, 2017). Los polifenoles terrestres tienen tres anillos interconectados, mientras que los polifenoles de las algas tienen hasta ocho anillos, que los hace de diez a cien veces más poderosos y estables como secuestradores de radicales libres (Mohamed *et al.*, 2012).

Mediante el método Folin-Ciocalteu, se ha cuantificado en *L. trabeculata* de 3,30 a 6,40 mg EFG/g de alga seca; en *M. pyrifera*, de 2,80 a 6,40 mg EFG/g, y en *P. binghamiae*, 7 mg EFG/g, valores comparables a los encontrados por Santome *et al.* (2016) en extractos acetónicos y etanólicos para las mismas especies (obtuvo valores de 2,60 a 5,10 mg EFG/g, de 0,70 a 2,50 mg EFG/g y de 2,40 a 3,30 mg EFG/g para cada especie, respectivamente).

Aún cuando en el presente trabajo no se ha trabajado con extractos orgánicos, la evaluación de extractos orgánicos ácidos fue hecha por Salas *et al.* (2015) y obtuvo como resultados los siguientes valores: en *L. trabeculata* es de 134 mg EFG/g de alga seca y en *M. pyrifera*, 280 mg EFG/g. A nivel internacional, Guinea *et al.* (2012) cuantificó 2,08 mg EFG/g de alga seca de *L. trabeculata* y 1,19 mg EFG/g de alga seca de *M. pyrifera*.

López *et al.* (2011) lograron identificar un total de 14 polifenoles en extractos de algas pardas, los cuales se encuentran involucrados en los procesos de fotoprotección. En el presente estudio se han utilizado los siguientes estándares para identificación: ácido gálico (polifenol predominante en los extractos del alga parda *Stypocaulon scoparium*), ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, miricetina y quercetina, los cuales fueron buscados en los extractos de algas ensayados como factores de protección. Se halló, en el orden

Laminareales, ácido gálico y ferúlico, mientras que en *P. binghamiae*, ácido protocatecuico y clorogénico, además de ácidos protocatecuico, vanílico y cafeico, y quercetina. Esto puede depender de la edad de la planta, su distribución en el gradiente de profundidad y la estacionalidad del muestreo (Núñez-Pons *et al.*, 2018).

En el 2008, Gomaa *et al.* (2008) propusieron un procedimiento microbiológico para demostrar la capacidad anti-UV de los bloqueadores solares comerciales, a partir del efecto letal que ejerce la radiación UV sobre las bacterias (Hockberger 2000 y 2002). Este daño se recrea en el laboratorio con ayuda de lámparas UV; sin embargo, en el mercado existe una gran cantidad de estas, y la que se ha usado en este trabajo tiene una menor intensidad en comparación con usada por Gomaa *et al.* (2008) y por Jones *et al.* (1998) por lo que es razonable hallar diferencias en el tiempo de reducción decimal de *E. coli*. Esto nos lleva a sugerir nuevos ensayos con tiempos más prolongados.

Nosotros hemos adecuado este M. M. para cuantificar el efecto pantalla anti-UV-B y anti-UV-C de los extractos de alga marina de una manera rápida, eficiente y de bajo costo, basados en protocolos empleados para la evaluación de fotoprotectores comerciales, la cual se llevó a cabo aplicando la crema sobre un soporte translúcido a la UVR. El soporte utilizado en el presente estudio fue el material de embalaje plástico tipo film y para inmovilizar los extractos algales en delgadas capas se empleó agarosa al 1,5 %, la cual es translúcido a la UVR, hecho que se demostró al aplicar la radiación UVR-C y UVR-B en las dosis ensayadas y lograr un 100% de actividad germicida. El mayor porcentaje de eficiencia anti-UV-C y anti-UV-B fue registrado en el extracto LTJ18 ($33,50 \pm 2,93$ % y $19,97 \pm 1,50$ %, respectivamente), mientras que los extractos MPJ26 ($17,80 \pm 1,11$ %) y PBJ18 ($16,80 \pm 1,53$ %) superaron el 10 % de eficiencia anti-UV-C, pero no anti-UV-B.

Este efecto pantalla anti-UV se debe a la presencia de polifenoles en las algas pardas, que están asociadas a la fotoprotección (Berthon *et al.*, 2017), el fotoenvejecimiento

(Thomas y Kim, 2011, 2013) y el efecto fotoreparador. Involucran diferentes mecanismos de acción que tienen que ver con el ingreso de los metabolitos activos a la célula (Mohamed *et al.*, 2012; Berthon *et al.*, 2017). En nuestro caso, solo se ha evaluado el efecto físico de pantalla o bloqueador, ya que los metabolitos de alga no se encuentran en contacto con las bacterias, pues están separados por un film plástico (Gomaa *et al.*, 2008) y, a diferencia de este último, los compuestos activos están distribuidos homogéneamente en un soporte de agarosa. La fotoprotección observada en las algas pardas no necesariamente se puede producir por un efecto pantalla o por refracción, ya que existe la posibilidad de que también actúen funciones reparadoras del daño, así como en los trabajos llevados a cabo con embriones de peces (Guinea *et al.*, 2012). Sin embargo, el M. M. usado permite medir solo el efecto de refracción o de absorción, ya que, para observar un efecto reparador, es necesario un contacto entre la bacteria y el extracto como en el ensayo con embriones de peces.

Los fotoprotectores solares en las últimas décadas han cobrado suma importancia; sin embargo, aún poseen limitaciones en cuanto a su uso, ya que existe una confusión de la cantidad necesaria que se debe usar y sobre el daño que sus componentes químicos causan al ambiente, que es finalmente donde se los desecha (Vogel, 2010; Mancebo *et al.*, 2014). Por eso, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas y métodos ecoamigables (Gonzalez *et al.*, 2007).

7. CONCLUSIONES

Los extractos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata* y *P. binghamiae* presentan, en su composición, polifenoles que han sido cuantificados por el método de Follin-Ciocalteu e identificados mediante RP-HPLC. Estos compuestos poseen una actividad pantalla anti-UV que varía dependiendo del tipo de polifenol presente en el extracto, por lo cual, a pesar de que este tenga una misma concentración de polifenoles, los resultados son distintos de un alga respecto de la otra. En las algas del orden Laminariales, se identificó principalmente ácido gálico y ferúlico, entre otros; mientras que en *P. binghamiae* se encontró únicamente ácido protocatecuico y ácido clorogénico.

La medición de la actividad se expresa a partir del porcentaje de eficiencia. Se destaca el extracto de *L. trabeculata* (LTJ18), con $33,50 \pm 2,93$ % ante la irradiación UV-C y $19,97 \pm 1,50$ % ante la irradiación UV-B. *M. pyrifera* (MPJ26) y *P. binghamiae* (PBJ18) tuvieron un efecto pantalla anti-UV-C importante también, con un promedio de $17,80 \pm 1,11$ y $16,8 \pm 0,28$, respectivamente.

Se adecuó exitosamente el M. M. de Gomaa *et al.* (2008) utilizando agarosa como soporte para la evaluación del efecto pantalla anti-UV, ya que permitió comprobar la eficiencia de la macroalgas ensayadas.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que la manipulación de los cultivos y el sembrado en placas se realice durante un máximo de 20 minutos a temperatura controlada ($< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), porque los cultivos pueden seguir en crecimiento y esto alteraría la lectura posterior afectando los resultados en el conteo de UFC sobrevivientes.

Hay que tener en cuenta que las pantallas o lentes de los distintos extractos gelificados con agarosa son muy delgados y se hace necesario tener a la mano espátulas u otros instrumentos que faciliten su retiro y así evitar que se rompan o pierdan.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENABBOU, A.K., DERRICHE, Z., FÉLIX, C., LEJEUNE, P., GUILLARD, C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*, Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2007, 76(3-4), 257-263.
- BERTHON, J., NACHAT-KAPPES, R., BEY, M., CADORET, J., RENIMEL, I., FILAIRE, E. Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*. 2017, 51(6), 555-567.
- BILBAO, J., GONZÁLEZ, P., DE MIGUEL, A. UV climatology in Central Spain. *International Journal of Climatology*. 2008, 28(14), 1933-1941.
- BILBAO, J., MATEOS, D., DE MIGUEL, A. Analysis and cloudiness influence on UV total irradiation. *International Journal of Climatology*. 2011, 31(3), 451-460.
- BISCHOF, K., GÓMEZ, I., MOLIS, M., HANELT, D., KARSTEN, U., LÜDER, U., ROLEDA, M., ZACHER, K., WIENCKE, C., AMILS, R., ELLIS-EVANS, C., HINGHOFER-SZALKAY, H. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. En: AMILS, R., ELLIS-EVANS, C., HINGHOFER-SZALKAY, H., eds. *Life in extreme environments*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 187-212. ISBN: 978-1-4020-6285-8.
- DÍAZ-CRUZ, M.S., BARCELÓ, D. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009, 28(6), 708-717.
- DIFFEY, B. Sunscreen isn't enough. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001, 64(2-3), 105-8.
- DOWNES, A., BLUNT, T.P. Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1877, 26, 488–500. (Citado por Hockberger, 2000)
- EISCHEID, A.C., LINDEN, K.G. Efficiency of pyrimidine dimer formation in *Escherichia coli* across UV wavelengths. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 103, 1650-1656.
- FOYO-MORENO, I., ALADOS, I., OLMO, F.J., ALADOS-ARBOLEDAS, L. The influence of cloudiness on UV global irradiance (295–385 nm). *Agricultural and Forest Meteorology*. 2003, 120(1-4), 101-111.
- GALLAGHER, R.P., LEE, T.K. Adverse effects of ultraviolet radiation. A brief review. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 2006, 92(1), 119-131.
- GILBERTZ, K.P., MEINEKE, V., PLACZEK, M. Ultraviolet exposure, health effects. En: *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington: Elsevier; 2011. p. 452-60. ISBN: 978-0-444-52272-6.

- GIOKAS, D.L., SALVADOR, A., CHISVERT, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, 26(5), 360-74.
- GOMAA, Y.A., ABOULMAGD, E., BORAEI, N.A., DARWISH, I.A., EL KHORDAGUI, L.K. Microbiological assessment of the ultraviolet screening effect of sunscreen preparations. *Journal of Cosmetic Science*. 2008, 59(4), 291-302.
- GOMES, A.A., SILVA-JÚNIOR, A.C., OLIVEIRA, E.B., ASAD, L.M., REIS, N.C., FELZENSZWALB, I., KOVARY, K., ASAD, N.R. Reactive oxygen species mediate lethality induced by far-UV in *Escherichia coli* cells. *Redox Report*. 2005, 10(2), 91-95.
- GONZÁLEZ, H., TARRAS-WAHLBERG, N., STRÖMDAHL, B., JUZENIENE, A., MOAN, J., LARKÖ, O., ROSEN, A., WENNBERG, A. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. *BMC Dermatology*. 2007, 7: 1.
- GUINEA, M., FRANCO, V., ARAUJO-BAZÁN, L., RODRÍGUEZ-MARTÍN, I., GONZÁLEZ, S. In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, 50(3-4), 1109-1117.
- HOCKBERGER, P.E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*. 2002, 76(6), 561-579.
- HOCKBERGER, P.E. The discovery of the damaging effect of sunlight on bacteria. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2000, 58(2-3), 185-191.
- HWANG, H., CHEN., T., NINES, R.G., SHIN, H.C., STONER, G.D. Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *International Journal of Cancer*. 2006, 119(12), 2742-2749.
- JONES, R.W., SMITH, S., BODEN, C., CARPENTER, B.G. A microbiological assay for the sun protection factor of sunscreen products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998, 50(Suppl. 9), 138.
- KULLAVANIJAYA, P., LIM, H. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005, 52(6), 937-958.
- LAURA VÁSQUEZ, Yulia. Bioactividad tipo auxina y citoquinina de extractos de macroalgas sobre cotiledones de *Cucumis sativus* L. Asesor: César Córdova Castañeda. Tesis título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2014.
- LÓPEZ, A., RICO, M., RIVERO, A., SUÁREZ DE TANGIL, M. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 2011, 125(3), 1104-1109.
- MADRONICH, S., MCKENZIE, R.L., BJÖRN, L.O., CALDWELL, M.M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 1998, 46(1), 5-19.

- MANCEBO, S.E., HU, J.Y., WANG, S.Q. Sunscreens, a review of health benefits, regulations, and controversies. *Photodermatology*. 2014, 32(3), 427-438.
- MCKENZIE, R., CONNOR, B., BODEKER, G. Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*. 1999, 285, 1709-1711.
- MOHAMED, S., HASHIM, S., RAHMAN H. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, 23, 83-96.
- MOSHAMMER, H., SIMIC, S., HALUZA, D. UV «Indices»—What Do They Indicate? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016, 13(10): E1041.
- NÚÑEZ-PONS, L., AVILA, C., ROMANO, G., VERDE, C., GIORDANO D. UV-Protective Compounds in Marine Organisms from the Southern Ocean. *Marine Drugs*. 2018, 16 (336).
- POEPPING, C., BECK, S.E., WRIGHT, H., LINDEN, K.G. Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection. *Water Research*. 2014, 56, 181-189.
- SALAS, N., LENGUA, R., BECERRA, E., BAZÁN, D., SANTOME, S., CÓRDOVA, C. Cuantificación de carbohidratos, polifenoles y sulfatos en extractos de macroalgas promisorias para la acuicultura. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 2014, 17 (2), 35-40.
- SÁNCHEZ-QUILES, D., TOVAR-SÁNCHEZ, A. Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environmental Science & Technology*. 2014, 48(16), 9037-9042.
- SANTOME, S., VERA, L., PÉREZ, N., LEANDRO, J., VELEZ, J., SALAS, N., LENGUA, R., BECERRA, E., ARBAIZA, L., CÓRDOVA, C. Actividad antioxidante *in vitro* mediante método de ABTS de dos tipos de extractos de macroalgas pardas. En: XXV Reunión científica ICBAR. Lima, 2016.
- SANTOS, A.J.M., MIRANDA, M.S., ESTEVES DA SILVA, J.C.G. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research*. 2012, 46(10), 3167-3176.
- SANTOS, A.L., OLIVEIRA, V., BAPTISTA, I., HENRIQUES, I., GOMES, N.C.M., ALMEIDA, A., CORREIA, A., CUNHA, A. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Archives of Microbiology*. 2013, 195(1), 63-74.
- SINHA, R.P., HÄDER, D.P. UV-induced DNA damage and repair, A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2002, 1(4), 225-236.
- TAN, K.C., LIM, H.S., JAFRI, Z.M. Study on solar ultraviolet erythral dose distribution over Peninsular Malaysia using ozone monitoring instrument. *The Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Sciences*. 2018, 21, 105-110.
- THOMAS, N.V., KIM, S.K. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Marine Drugs*. 2013, 11(1), 146-164.

- THOMAS, N.V., KIM, S.K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011, 32(3), 325-335.
- TING, W.W., VEST, C.D., SONTHEIMER, R. Practical and experimental consideration of sun protection in dermatology. *International Journal of Dermatology*. 2003, 42, 505-513.
- TOVAR-SÁNCHEZ, A., SÁNCHEZ-QUILES, D., BASTERRETXEA, G., BENEDÉ, J.L., CHISVERT, A., SALVADOR, A., MORENO, I., BLASCO, J. Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *PLoS One*. 2013, 8(6): e65451.
- VOGEL, L. Canadians confused and conflicted over sun protection products. *Canadian Medical Association Journal*. 2010, 182(11), E507-8.
- WANG, L., GONG, W., MA, Y., HU, B., WANG, W., ZHANG, M. Analysis of ultraviolet radiation in Central China from observation and estimation. *Energy*. 2013, 59, 764-774.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERSUN. The Global UV Project, a guide and compendium. Ginebra: World Health Organization, 2003.

10. ANEXOS

Anexo 1. Prueba Chi-cuadrado de bondad de ajuste con un intervalo de confianza al 95 %

# UFC esperadas	# UFC observadas		
100	91		
100	108		
100	113		
104	111		
104	97		
104	113		
104	108		
104	99		
98	113	α	5 %
98	103	r	2
98	98	k	26
108	97	gl	25
108	95	valor crítico	37,6525
108	90	χ^2 prueba	25,64
108	90	P-VALOR	42,68 %
108	98	Decisión	No se rechaza la Ho
90	93	Ho: no habrá diferencia significativa entre los valores esperados y observados. H1: (sí) habrá diferencia significativa entre los valores esperados y observados	
90	95		
90	81		
90	85		
28	20		
28	26		
28	27		
28	23		
28	36		
281	264		

Anexo 2. Características de los materiales y equipos utilizados

✓ **Material biológico**

Cepa estándar *E. coli* ATCC 25922

✓ **Polifenoles estándares**

Ácido gálico : Sigma-Aldrich, CAS 149-91-7

Ácido protocatecuico : Sigma-Aldrich, CAS 99-50-3

Ácido vanílico : Sigma-Aldrich, CAS 121-34-6

Ácido cafeico : Sigma-Aldrich, CAS 331-39-5

Ácido sirínico : Sigma-Aldrich, CAS 530-57-4

Ácido clorogénico : Sigma-Aldrich, CAS 327-97-9

Ácido cumárico : Sigma-Aldrich, CAS 501-98-4

Ácido ferúlico : Sigma-Aldrich, CAS 537-98-4

Miricetina : Sigma-Aldrich, CAS 529-44-2

Quercetina : Sigma-Aldrich, CAS 117-39-5

✓ **Equipos**

Estufa : Estufa universal Memmert GmbH + Co.KG modelo UFE 400, con flujo de aire caliente, de temperatura y tiempo programable.

Incubadora : Incucell, de temperatura y tiempo programable.

Molino : Moulinex, molino eléctrico

Centrífuga : Gemmy Industrial Corp., modelo PLC-03.

Espectrofotómetro : Genesys 10S UV-VIS

Balanza : KERN®, modelo ABJ-220-4NM

Lámpara UV : Vilbert Lourmat, modelo VL-6.MC

Micropipeta : Axypet, modelo AP-1000/100 - 1000 µl

✓ **Medios de cultivo y reactivos**

TSB : BD - DIFCO, MCB0002

Agarosa : Sigma-Aldrich, A4718-100G

Follin-Ciocalteu : Supelco, 109001

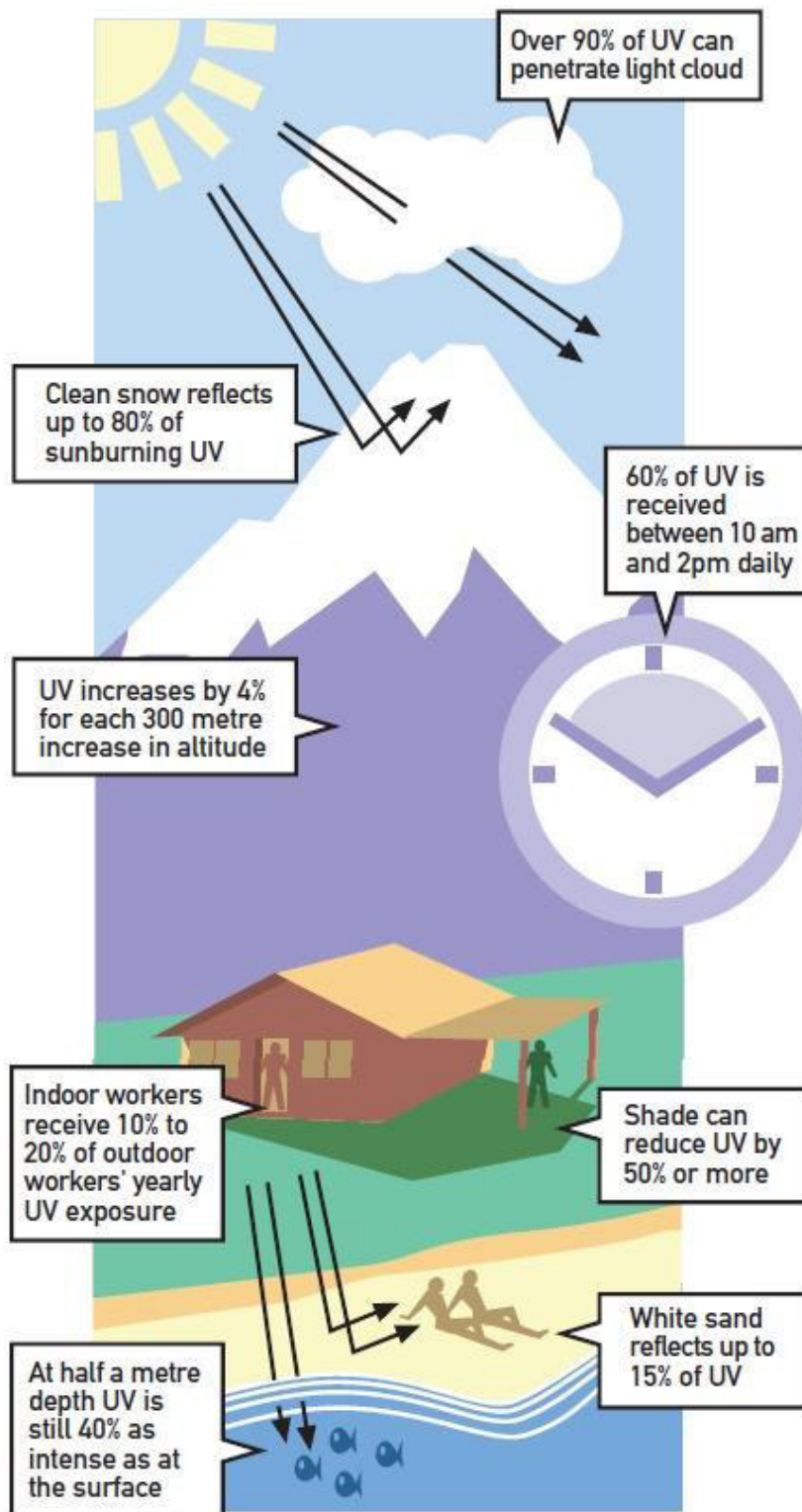
Na₂CO₃ : Supelco, 102405

Floroglucinol : Supelco, 107069

✓ **Materiales de vidrio**

Pipetas, vasos de precipitación, placas petri, probetas y matraces

Anexo 3. Factores ambientales que influyen en la intensidad de la radiación ultravioleta



Fuente: WHO, 2003.